

# RT-PCR(reverse transcription coupled polymerase chain reaction) 法を用いた冬期豚血液中からの日本脳炎ウイルス遺伝子の検出

山西 重機・藤井 康三・亀山 妙子  
池尻久仁子\*・三木 一男

## I はじめに

日本脳炎患者は激減したものの依然として西日本地域では、高齢者を中心として患者発生がみられ、夏期にはウイルスを保有した蚊の蔓延が観察され、無視できない伝染病の一つであるが、現在のところ冬期におけるウイルスの実態はわかっていない。周囲を海によって隔離され、冬期間に蚊のいなくなる我が国で日本脳炎ウイルスは如何にして存続するのであろうか。先の調査<sup>1)</sup>で我々は、冬期間の豚血液中からIgM抗体を検出し、新規のウイルス感染があることを間接的に証明したがウイルスは分離はできなかった。しかし県下の限定された地域内で、感染源の問題はのこるが、少ない頻度で日本脳炎ウイルスによる初感染がくりかえし起こっていることと考えた。今回、新たに日本脳炎ウイルスの特定領域の遺伝子を増幅し検出する高感度のRT-PCR法<sup>2)</sup>を用いて、冬期間の豚血液から日本脳炎ウイルス遺伝子を検出確認したのでその概要について報告する。

## II 材料と方法

### 1. 豚血液材料の採取

香川県内で飼育されている生後6~7ヶ月豚から採血し、等量のアルスパー液を加え、直ちに冷却搬入し、-80℃に保存し実験に供した。

### 2. 豚血液中からの日本脳炎ウイルスRNAの抽出

グアニジウムチオシアネートを用いた方法<sup>2) 3)</sup>で、図1に示すようにおこなった。豚血液に5倍量の6MGT C mix (6M Guanidine thiosianate, Sodium cytrate, Sodium laurylsalcosinate)を加え攪拌し、Yeast tRNAを加える。そしてフェノールおよびクロロホルム:イソアミルアルコール(24:1)処理で抽出し、その上清に酢酸ナトリウム、イソプロパノールを加え、-20℃に置いた。遠心後上清を捨てエタノールで洗い沈澱させて回収しTE液で再浮遊させ、抽出RNAとした。

### 3. cDNAの合成と増幅PCR<sup>2) 3)</sup>

cDNAの合成反応は、図2に示すように抽出RNAに

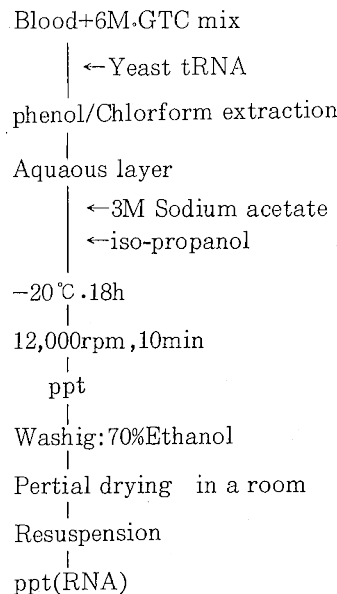


図1 豚血液中からの日本脳炎ウイルスRNA抽出

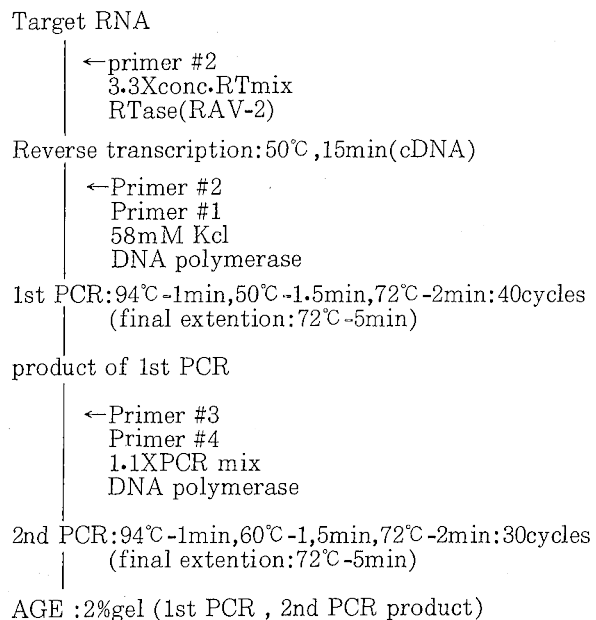


図2 cDNAの合成と増幅PCR

逆転写酵素: RTase(RAV-2)と Antisence primer(JEP-2), dNTPsmixを加え50℃15分反応させcDNAを作成した。増幅PCRはdNTPsmix,sence primer(JEP-1),anti-

\*香川県立中央病院

sence primer (JEP-2), Taq DNA合成酵素を加えて熱変成 (94°C - 60秒), アニール (50°C - 90秒), 相補鎖合成 (72°C - 120秒) の条件で1st PCRを40サイクルでおこなった。さらにfinal extension (72°C - 300秒) をおこなった。

2nd PCRは, 1st PCR反応生成物にdNTPsmix, sense primer (JEP-3), antisense primer (JEP-4), Taq DNA合成酵素を加え, 熱変成 (94°C - 60秒), アニール (60°C - 90秒) 相補鎖合成 (72°C - 120秒) の条件でPCR 30サイクルでおこなった。さらにfinal extension (72°C - 300秒) をおこなった。

1st 2nd PCR反応生成物を2%アガロース (LO3: タカラ) 電気泳動をおこないエチジウムブロマイドによるDNA染色で増幅されたcDNA fragmentのバンドを確認した。分子量マーカーとして1000, 700, 500, 400, 300, 200, 100そして50 base pairsのものをを用いた。

#### 4. Oligonucleotide Primers

表1に示すプライマーは阪大微研観音寺研究所から分与を受けた。図3はエンベロープ蛋白コード領域<sup>4)</sup>における1st PCR特定増幅部位1218~1458塩基とそれを増幅するプライマーJEP-1, JEP-2と2nd PCR特定増幅部位1248~1328塩基とそれを増幅するネステイグプライマーであるJEP-3, JEP-4の位置を示した<sup>2)</sup>。

表1 Oligonucleotide Primers

#JEP-1	5-CACAA CGAGA AGCGA GCTGA TAGTA
#JEP-2	5-CCCCA ACTTG CGCTG AATAA TTCCC
#JEP-3	5-GTGTG CAAAC AAGGC TTCAC TGATC
#JEP-4	5-TTTCC GAAGT GGTGG TTCCA TGCAC

#### 5. 制限酵素による切断<sup>5)</sup>

PCR生成物の切断には制限酵素Fok-I, Nsp-Iを用

いた。反応液は, 緩衝液, 制限酵素, PCR生成物を混合し, 37°C 60分間反応させた。反応後アガロース電気泳動によって切断パターンを確認した。Fok-Iは128bpと53bp, Nsp-Iは104bpと77bpに切断できる。

#### 6. 日本脳炎ウイルスの分離

RT-PCR法により遺伝子を検出した血液について既報の方法<sup>6)</sup>でC6/36細胞 (ヒトスジシマカ由来細胞) に接種し, 1週間28°Cで培養した。そして培養上清を3回継代した。併せて乳のみマウス (生後48時間) 脳内に接種<sup>6)</sup>し, 経過を観察した。

継代毎に培養上清と発症マウス脳乳剤についてELISAで日本脳炎抗原<sup>1)</sup>の検出をおこなった。

### III 調査結果

#### 1. 日本脳炎標準ウイルス株における遺伝子の検出

写真1に示すようにJaGAR-01株, 中山株においてそれぞれ1st PCRで241bp, 2nd PCRで181bpのcDNA fragmentを確認した。

#### 2. 豚血液中からの日本脳炎ウイルス遺伝子の検出

表2に1993年6月から94年4月にかけて採血した香川県内の飼育豚311例についてRT-PCR法で遺伝子検出をおこなった。1st PCRでは全例陰性であったが2nd PCRで181bpのバンドが27例検出できた。1~4月の冬季間でみると141例中2nd PCRで14例が検出された。写真2に冬期間の一部の豚血液7例の遺伝子検出例を示した。2nd PCRで181bpの増幅が確認できた。

#### 3. 制限酵素による切断

PCR生成物をFok-I, Nsp-Iで切断した。アガロース電気泳動によるためFok-Iでは128bpは検出できるが53bpは確認できなかった。Nsp-Iは104bp, 77bpともに確認できた。写真3に冬期間の一部血液4例の2nd PCR生成物の制限酵素切断パターンを示した。

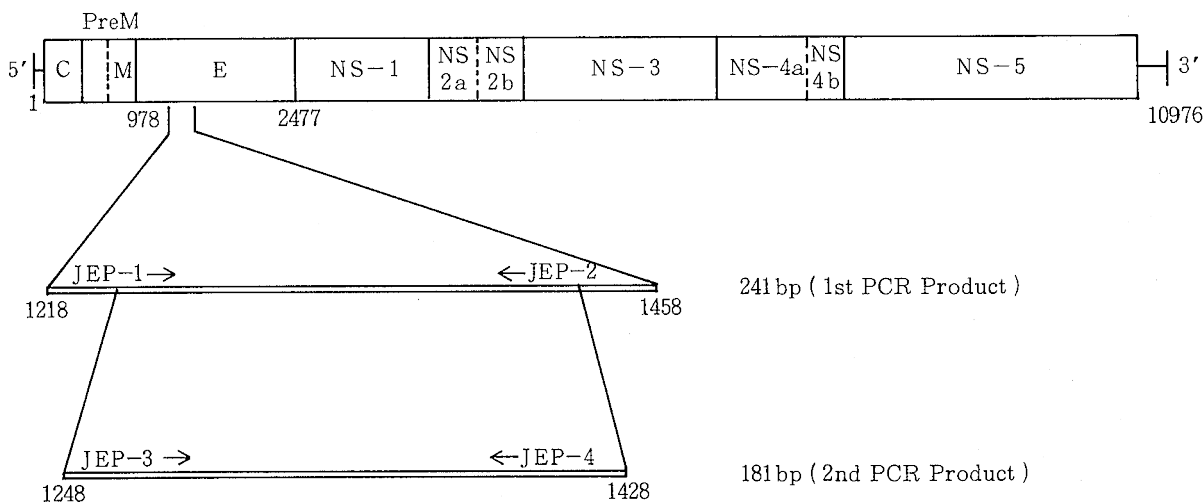


図3 日本脳炎ウイルスcDNA増幅部位とプライマー

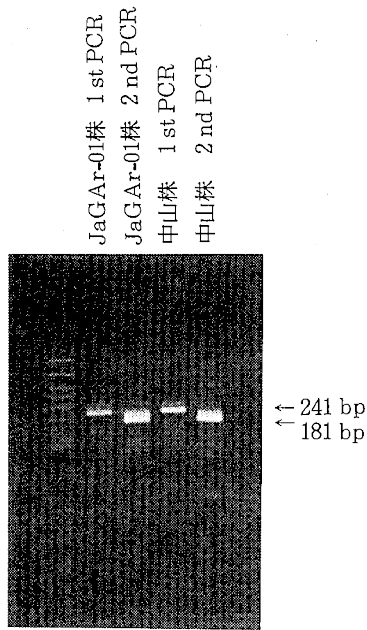
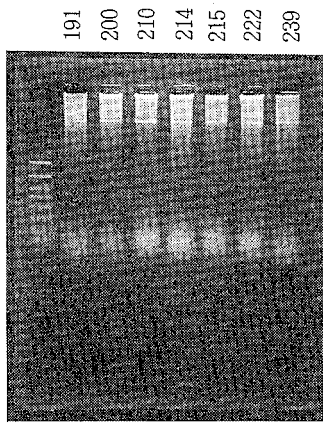


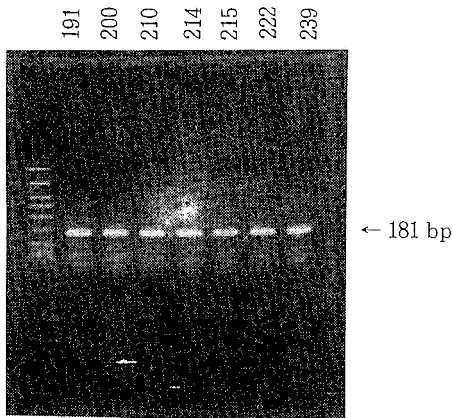
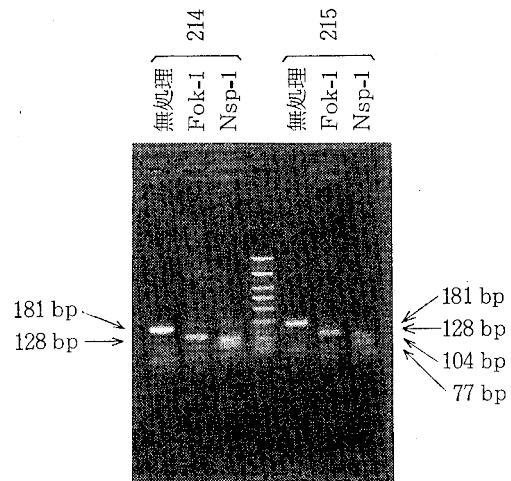
写真1 日本脳炎ウイルス標準株における遺伝子の検出

表2 豚血液中からの日本脳炎ウイルス遺伝子の検出

採血月日	飼育場所	検体数	RT-PCR		ウイルス分離
			1st	2nd	
6月17日	香川町	20	0	2	0
6月18日	長尾町	30	0	3	0
7月12日	長尾町	20	0	1	1
8月9日	高松市	20	0	2	2
9月13日	長尾町	20	0	4	1
10月21日	綾南町	20	0	1	0
11月18日	詫間町	20	0	0	—
12月16日	詫間町	20	0	0	—
1月13日	綾南町	20	0	2	0
1月26日	高瀬町	21	0	3	0
2月7日	高松市	20	0	3	0
2月18日	豊浜町	20	0	1	0
3月8日	財田町	20	0	2	0
3月24日	愛媛町	20	0	3	0
4月6日	長尾町	20	0	0	—



1st PCR



2nd PCR

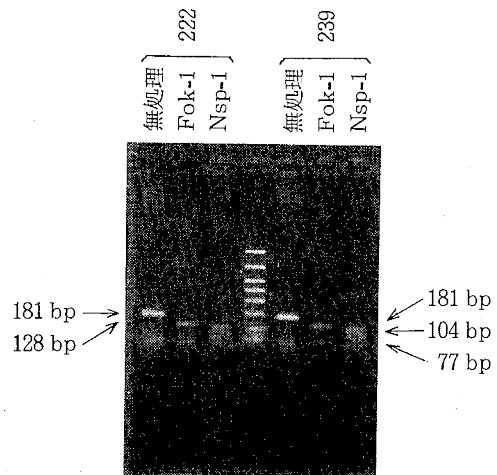


写真2 冬期間における豚血液中からの日本脳炎ウイルス遺伝子の検出

写真3 2nd PCR産物の制限酵素による切断

#### 4. 日本脳炎ウイルスの分離

C6/36細胞と乳のみマウスを併用して2ndPCRで遺伝子を検出した豚血液からウイルス分離をおこなった。

表2に示すように7～9月の夏期間では4株分離できたが冬期間では分離できなかった。

#### 5. 日本脳炎標準ウイルス株と分離ウイルス株の

##### PCR生成物の違い

JaGAR-01株, 中山株については, 1st PCRで241 bp, 2nd PCRで181 bpのフラグメントが検出, 豚血液中からの検出cDNAフラグメントは2nd PCRで181 bpのみが検出された。また夏期間に培養分離したウイルス株でも同様に1st PCRは陰性で2nd PCRで181 bpのフラグメントが検出された。

### IV 考 察

冬期間における日本脳炎ウイルスの活動は, よく知られていないが現在云われていることは<sup>8)</sup> ①常在地からのウイルス保有蚊, ウイルス感染渡り鳥の飛来, ②ウイルス保有蚊の成虫のままの越冬, ③他の脊椎動物たとえばコウモリ, けつ歯類, 冷血動物(ヘビ, カエル, トカゲなど)にウイルスが潜伏感染して越冬, などである。著者らは先のウイルス越冬調査<sup>1)</sup>で, 冬期間豚血液からのウイルスIgM抗体を検出確認した。このことから媒介動物の問題はこのころが県下の限定された地域のなかで豚間で散発的初感染が発生していると推察した。しかしIgM抗体の検出できた同一血液も含めて同グループ血液からは日本脳炎ウイルスは分離できなかった。

このことから極微量DNA診断法, 迅速診断法として近年開発されたPCR法<sup>9)</sup>を用いて検討をおこなった。このPCR法は対象とする特定領域のDNA片を増幅させ, 超微量DNAも検出必要量までに増幅することにある。豚血液中からウイルス遺伝子を直接検出することは培養などによってウイルスを分離したことと意義を同じくすることと考える。

日本脳炎ウイルス特異的プライマーは, エンベロープ蛋白のコード領域<sup>3)</sup>(978～2477塩基)を増幅するプライマーで, 検出限界で村上ら<sup>2)</sup>は10/virus particles(65%検出), 100/virus particles(100%検出)と報告している。他法との比較による検出感度は, 木村ら<sup>10)</sup>がC6/36細胞によるコガタアカイエカからのウイルス分離率で24.4%, 第1次PCRで27.9%, nested PCRで67.4%と高いことを報告している。今回の豚血液中からの日本脳炎遺伝子の検出は, 1st PCR法(outer PCR)で増幅バンドは241 bp, 2nd PCR法(inner PCR)で増幅バンド181 bpを確認した。PCR生成物の確認方法<sup>11)</sup>についてはサザンハイブリダイゼーション法が信頼できる方法であ

るが今回はnested PCRのためウイルス遺伝子が確定できる。また併せてDNA制限酵素Fok-I, Nsp-Iの切断パターンをアガロースゲル電気泳動で確認するなどで同定した。

日本脳炎標準ウイルス(JaGAR-01, 中山株)では241 bp, 181 bpそれぞれ確認できたが, 年間をとおした豚血液中からの遺伝子検出では1st PCR法で全例陰性であったが生成物による再増幅のインナー2nd PCRで181 bpのcDNA fragmentを検出した。豚血液中から241 bpを検出できないことは①遺伝子が増幅しているが検出できない, ②塩基配列の相違部分があるか, ③インヒビターの影響(例えばグアニジウムチオシアネートなどが残っている)などが考えられる。

豚血液中から27例の日本脳炎遺伝子が確認できこのうち1～3月期間に14例検出できた。遺伝子の検出できた豚血液から乳のみマウス脳内接種法, C6/36細胞接種法を併用したウイルス分離で夏期間は分離できるが冬期間では現在までのところ分離できない。夏期間増殖分離したウイルスからの遺伝子検出では豚血液中の遺伝子と同様に241 bpは陰性で, 181 bpは確認することができた。また制限酵素による切断パターンの確認で日本脳炎ウイルス遺伝子が冬期間の1月5例, 2月4例, 3月5例確認できた。

母豚の死流産胎児による感染時期特定など間接的な冬期間ウイルス活動の報告はあるが直接日本脳炎ウイルス遺伝子検出は国内で初めてのことである。しかし冬期間とはいえ媒介動物の問題は残る。このことからひきつづき越冬蚊, 環境周辺の小動物などからPCR法を用いたウイルス遺伝子の検索と同時に細胞培養等によるウイルス分離などつづけて行いたい。

### V ま と め

1. RT-PCR法を用いて1993年6月から94年4月の豚血液311例から27例の日本脳炎ウイルス遺伝子を検出した。
2. RT-PCR法を用いて冬期間である1月5例, 2月4例, 3月5例の14例の日本脳炎ウイルス遺伝子を検出した。
3. RT-PCR法を用いて日本脳炎標準ウイルス株(JaGAR-01株, 中山株)では1st PCRで241 bp, 2nd PCRで181 bpのcDNA fragmentを確認したが, 豚血液中からの検出遺伝子, 分離ウイルスでは1st PCR陰性, 2nd PCRで181 bpを検出確認した。
4. 制限酵素Fok-I, Nsp-Iを用いて2nd PCR生成物181 bpを切断するとFok-Iは128 bpと53 bp, Nsp-Iは104 bpと77 bpに切断できた。

5. 検出した日本脳炎ウイルス遺伝子の豚飼育地域に特定個所はなく、県下全域にわたっている。
6. C6/36細胞と乳のみマウスを併用して、2nd PCRで日本脳炎ウイルス遺伝子を検出した豚血液からウイルス分離をおこなった。夏期間で4株分離できたが、冬期間では分離できなかった。

## 文 献

- 1) 山西重機 三木一男, 山本忠雄: 越冬日本脳炎ウイルス解明のための研究, ELISAによる豚血漿中からの抗原の検出, 香川県衛生研究所報, 15, 20~23, ( 1986 )
- 2) Shigeki Murakami, Yoshiyuki Takahashi, Shigeru Yoshida, Isao Fuke, Kozo Ohmae, Chisato Mori, Mitsuo Takagi, Akihisa Takamizawa, and Hiroto Okayama: Highly Sensitive Detection of Viral RNA Genomes in Blood Specimens by An Optimized Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, J Med Virology ( 投稿中 )
- 3) 田中静吾, 上田國寛: PCRの基礎と応用, RT-PCR, 医学のあゆみ, 162, 503~506, ( 1992 )
- 4) Hideo Sumiyoshi, Chisato Mori, Isao Fuke, Koichi Morita, Satoshi Kuhara, Jun Kondou, Yo Kikuchi, Hiroshi Nagamatu, and Akira Igarashi: Complete Nucleotide Sequence of the Japanese Encephalitis Virus Genome RNA, Virology, 161, 487~510, ( 1987 )
- 5) 清水信義, 長野敬: DNAサイエンス, 制限酵素によるDNAの解析, 231~240, 医学書院 ( 1993 )
- 6) 五十嵐章: ヒトスジシマカ培養細胞クローンC6/36を用いた野外採取コガタアカイエカから日本脳炎ウイルスの分離方法, 熱帯医学, 22, 225~264, ( 1980 )
- 7) 大谷明, 清水文七: アルボウイルス, ウイルス実験学各論, 国立予防衛生研究所編, 183~224, 丸善 ( 1982 )
- 8) 大里外誉郎: 医科ウイルス学, フラビウイルス科, 359~366, 南江堂 ( 1992 )
- 9) Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn DT, Erlich HA, Arnheim N: Enzymatic amplification of betaglobulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, Science, 230, 1350~1354 ( 1985 )
- 10) 木村朝昭, 弓指孝博, 山崎謙治, 小田美光, 原嘉宏, 木村明生, 中村央, 吉田政弘, 峰川好一: PCR法による野外採取蚊からの日本脳炎ウイルスゲノムの検出, 大阪府立公衛研所報, 公衆衛生編, 30, 59~64, ( 1992 )
- 11) 森田公一, 田中真理子, 五十嵐章: PCR法を用いたフラビウイルスの迅速診断法の開発に関する基礎的研究, 臨床とウイルス, 18, 322~325, ( 1990 )